

校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520100154082

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

**SERPINS 对眼部抗新生血管和抗炎的作用及机制**

**Anti-Angiogenic, Anti-Inflammatory Effects and**

**Mechanisms of SERPINS on Eye**

刘晓琛

指导教师姓名：马建兴 教授 刘祖国教授

专 业 名 称：生 理 学

论文提交日期：2013 年 月

论文答辩时间：2013 年 月

学位授予日期：2013 年 月

答辩委员会主席：\_\_\_\_\_

评 阅 人：\_\_\_\_\_

2013 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

---

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

## 摘 要

### 第一部分：SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤的抗新生血管和抗炎作用

**目的：**角膜碱烧伤是眼表常见的化学损伤，其特征是引起眼部新生血管和炎症的急性反应，目前对其病理机制还不十分明了而且缺乏理想的治疗方法，所以一直成为眼科面临的一个十分棘手的难题。本论文旨在探讨 SERPINA3K 对碱烧伤后角膜的新生血管和炎症的治疗，并对其中的可能机制进行研究。

**方法：**正常成年雄性 Wistar 大鼠实施角膜碱烧伤后，正常未碱烧伤的大鼠为阴性对照，实验分为 4 组：未进行碱烧伤对照组、碱烧伤后 PBS 处理组、碱烧伤后 BSA 处理组、碱烧伤后 SERPINA3K 治疗组。每组每只大鼠每天滴眼 4 次，滴眼剂量为 20 $\mu$ g/eye/day，连续滴眼 7 天。分别在第 1 天，第 2 天，第 5 天，第 8 天临床检测角膜新生血管面积、炎症指数、上皮荧光素钠染色。组织切片 H&E 染色观察角膜病理改变。Western blot 检测角膜新生血管生长因子、色素上皮衍生因子、炎症因子和表皮生长因子受体即 VEGF、PEDF、TNF- $\alpha$ 、EGFR 的蛋白水平。免疫荧光染色检测角膜 EGFR 的表达。MTT 细胞存活实验检测 SERPINA3K 对 HCE 和 HUVEC 细胞增殖的影响。

**结果：**我们发现对碱烧伤后的大鼠角膜进行 SERPINA3K 滴眼局部用药 7 天，与 BSA 或者 PBS 对照组相比，新生血管面积明显降低。根据临床炎症指数分析，SERPINA3K 组对碱烧伤后角膜炎症也有抑制作用。SERPINA3K 还可增强碱烧伤后角膜上皮的修复作用。其中的可能机制与 SERPINA3K 可以调节促新生血管和抑制新生血管因子的水平，如下调 VEGF，上调 PEDF 有关；SERPINA3K 还可抑制炎症因子 TNF- $\alpha$  的水平，并可以明显提高 EGFR 在角膜上皮的表达。同时，SERPINA3K 抑制 HUVEC 细胞的增殖，但对 HCE 细胞的增殖基本没有影响。

**结论：**SERPINA3K 对碱烧伤后大鼠角膜新生血管和炎症有治疗作用，并对角膜上皮有促修复作用。其中的可能机制与 SERPINA3K 减低角膜 VEGF、TNF- $\alpha$ ，上调 PEDF、EGFR 因子的表达有关。本论文的研究为临床上治疗角膜新生血管提供了新的方向和途径。

**关键词：**SERPINA3K，碱烧伤，新生血管，炎症，上皮修复

### 第二部分：SERPINA4 对糖尿病视网膜新生血管及炎症的治疗及机制

**目的：**最近临床研究发现患有糖尿病视网膜病变患者的玻璃体中，SERPINA4 的表达明显下降，但在血清中的 SERPINA4 表达反而升高。本论文旨在研究高表达 SERPINA4 对糖尿病视网膜病变的作用及其可能的机制。

**方法：**我们建立了 C57BL/6NJ 小鼠在视网膜等多器官高表达 SERPINA4 的转基因动物模型。利用 OIR 模型诱导视网膜新生血管，检测视网膜新生血管面积和视网膜新生血管细胞数。利用 SERPINA4 转基因小鼠与糖尿病 Akita 小鼠杂交产生的 Akita x SERPINA4 转基因小鼠，检测了视网膜血管内皮粘附的炎症细胞数和视网膜血管渗漏。利用 Wnt 报告基因 BAT-gal 转基因小鼠与 SERPINA4 转基因小鼠杂交 BAT-gal x SERPINA4 转基因小鼠中，检测了 Wnt 信号通路在糖尿病视网膜病变中的变化。Western blot 检测 LRP6 和 non-pi- $\beta$ -catenin 在 OIR 模型和糖尿病模型视网膜中的表达，同时，ELISA 检测 VEGF、ICAM-1 在以上两个模型中的表达。利用 TOPFLASH 检测 SERPINA4 对 Wnt 信号通路的调节。Western blot 检测 SERPINA4 对视网膜细胞的 pi-LRP6、LRP6、VEGF、TNF- $\alpha$  表达的调节。免疫共沉淀方法检测 SERPINA4 与细胞膜外端 LRP6 的特定的结合。

**结果：**在 OIR 模型中，SERPINA4 的高表达可以明显的减轻视网膜新生血管面积和新生血管细胞数。在 SERPINA4 转基因小鼠与 Akita 杂交动物模型中，视网膜血管渗漏、血管内皮白细胞粘附、由于高糖引起的 VEGF 和 ICAM-1 的过表达均明显降低。SERPINA4 的高表达也抑制由 OIR 和糖尿病模型引起的 Wnt 信号通路的激活。在 STZ 诱导的糖尿病 Wnt 报告基因鼠 BAT-gal 与 SERPINA4 转基因鼠杂交动物模型中，SERPINA4 可以抑制由于糖尿病引起的视网膜的 Wnt 信号通路的激活。在离体培养视网膜细胞中，SERPINA4 可以阻断由于高糖和 Wnt3a 诱导的 Wnt 信号通路的激活。免疫共沉淀和 LRP6 的结合实验均显示 SERPINA4 可以与 Wnt 的共受体 LRP6 有高度的特异结合 ( $K_d=4.5nM$ )。

**结论：**本文以 OIR 和 Akita 为糖尿病视网膜新生血管模型，解释了 SERPINA4 作为内源性配体抑制 Wnt 信号通路，并且与 LRP6 结合，下调包括 pi-LRP6、non-pi- $\beta$ -catenin、ICAM-1、VEGF、TNF- $\alpha$  在内的 Wnt 信号通路上下游因子，证明了 SERPINA4 治疗视网膜新生血管和炎症的作用以及可能的分子机制。

**关键词：**SERPINA4，糖尿病视网膜病，新生血管，炎症，Wnt

## Abstract

### **Part 1. Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of SERPINA3K on corneal injury**

**Purpose:** Corneal alkali burn is a common ocular surface disease and lacks satisfactory therapies. It is a comprehensive pathological response of cornea to a combination of factors such as neovascularization and inflammation. The purpose of this study was to investigate the anti-angiogenic and anti-inflammatory effect of SERPINA3K on the cornea injury and its underlying mechanism.

**Methods:** Wistar rats were divided into 4 groups: rats without cornea alkali burn as negative control, PBS treatment after alkali burn, BSA treatment after alkali burn, and SERPINA3K treatment after alkali burn. Topical treatment was applied to the injured rat eyes four times daily for 7 days. SERPINA3K was given at dose of 20 µg/eye/day. All eyes were observed on day 1, 2, 5 and 8 for evaluation of cornea neovascularization area, inflammation index, corneal epithelium fluorescein staining. Corneal pathologic changes were examined by H&E staining. Western blot assay was used to detect VEGF, PEDF, TNF- $\alpha$ , EGFR protein levels of cornea. The expression of corneal EGFR was also evaluated by immunofluorescent staining. MTT assay was applied to measure the effect of SERPINA3K on the cell proliferation of HCE and HUVEC cells.

**Results:** After topical treatment was applied to the injured rat eyes for 7 days, SERPINA3K group significantly reduced the neovascular area of rat injured cornea, compared to the BSA and PBS group. According to the clinical inflammation index analysis, SERPINA3K group also suppressed the corneal inflammation. SERPINA3K also improved the recovery of corneal epithelium. The possible underlying mechanism involved might be through the regulation of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors, i.e. down-regulating VEGF or up-regulating PEDF. In addition, SERPINA3K also specifically inhibited proliferation of HUVEC cells. Moreover, SERPINA3K suppressed corneal inflammatory via inhibiting TNF- $\alpha$  expression. SERPINA3K enhanced the EGFR expression in the corneal epithelium layer.

**Conclusions:** SERPINA3K has therapeutic effects on alkali burn-induced corneal neovascularization and inflammation, and enhances corneal epithelium recovery. The possible mechanism may be related to the down-regulation of VEGF, TNF- $\alpha$ , up-regulation of PEDF, EGFR by SERPINA3K in the injured rat cornea. SERPINA3K can inhibit the

## Abstract

---

HUVEC cells proliferation, but barely have effect on HCE cells. We used the rat corneal alkali burn as an animal model, provided experimental evidences and a new direction of exploring new agents against corneal neovascularization.

**Key words: SERPINA3K, alkali burn, neovascularization, inflammation, epithelium recovery**

厦门大学博硕士论文摘要库

---

## **Part 2. Effects of SERPINA4 on diabetic retinopathy induced neovascularization, inflammation and its underlying mechanisms**

**Purpose:** SERPINA4 is decreased in the vitreous of patients with diabetic retinopathy, while increased in the circulation of diabetic patients, compared to normal patients. The objective of this study was to investigate the role of SERPINA4 in diabetic retinopathy and its underlying mechanism.

**Methods:** We generated SERPINA4 transgenic C57BL/6NJ mice over-expressing SERPINA4 in multiple tissues including the retina. We detected neovascular area and number of pre-retinal neovascular cells in OIR model. Genetically crossing SERPINA4 transgenic mice with diabetic Akita mice, we generated Akita x SERPINA4 transgenic mice. We examined retinal leukostasis and vascular leakage. Furthermore, we generated BAT-gal x SERPINA4 transgenic mice by genetically crossing the Wnt reporter (BAT-gal) transgenic mice with SERPINA4 transgenic mice, and measured Wnt signaling change during the diabetic retinopathy. Western blot was conducted to analyze the expression of LRP6 and non-pi- $\beta$ -catenin in OIR and diabetic retinopathy models. ELISA assay was used to detect the levels of VEGF and ICAM-1 in two models. Regulatory effect of SERPINA4 on Wnt signaling pathway was measured by TOPFLASH. The expression of pi-LRP6, LRP6, VEGF, and TNF- $\alpha$  in cultured ARPE19 cells was detected by Western blot. Immunoprecipitation assay was performed to detect the specific binding of SERPINA4 to LRP6.

**Results:** In the OIR model, over-expression of SERPINA4 significantly reduced the retina neovascularization. It was demonstrated that retinal vascular leakage and leukostasis, VEGF and ICAM-1 over-express induced by high glucose, were decreased in the SERPINA4 x Akita animal model, compared to the Akita animal. SERPINA4 over-expression also suppressed the Wnt signaling pathway activation induced by OIR and diabetic animal models. In the STZ induced BAT-gal x SERPINA4 transgenic mice, SERPINA4 inhibited the Wnt signaling pathway activation induced by diabetes. In the in vitro assay, we cultured the retinal cells, SERPINA4 blocked the Wnt pathway activation induced by high glucose and Wnt3a. Moreover it was shown by immunoprecipitation assay that SERPINA4 specifically binds to Wnt coreceptor LRP6 ( $K_d=4.5\text{nM}$ ).

**Conclusions:** We applied OIR and Akita as the diabetic neovascular animal models, demonstrated that SERPINA4 as an endogenous inhibitor, has anti-angiogenic and anti-inflammatory effects and SERPINA4 inhibits Wnt signaling pathway via binding to



## Abstract

---

LRP6 and down-regulating Wnt pathway factors including pi-LRP6, non-pi- $\beta$ -catenin, ICAM-1, VEGF and TNF- $\alpha$ .

**Key words:** SERPINA4, dabeitc retinopathy, angiogenesis, inflammation, Wnt

厦门大学博硕士论文摘要库

摘    要 .....	I
Abstract .....	III
目    录 .....	VII
Catalogue .....	X
第一部分 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤的抗新生血管和抗炎作用 .....	1
第一章 前    言 .....	1
第二章 实验材料与方法 .....	5
2.1 实验材料 .....	5
2.1.1 细胞株、实验动物 .....	5
2.1.2 主要化学试剂和耗材 .....	5
2.1.3 抗体 .....	5
2.1.4 哺乳动物细胞培养试剂 .....	6
2.1.5 主要仪器 .....	6
2.1.6 主要溶液的配制 .....	7
2.1.6.1 组织、细胞染色相关溶液 .....	7
2.1.6.2 细胞培养相关溶液 .....	8
2.1.6.3 蛋白质抽提及电泳相关溶液 .....	8
2.1.6.4 其他溶液 .....	9
2.2 实验方法 .....	9
2.2.1 蛋白纯化 .....	9
2.2.2 角膜碱烧伤模型 .....	9
2.2.3 新生血管及炎症的评估 .....	10
2.2.4 角膜上皮缺损的评估 .....	10
2.2.5 H&E 染色和免疫组织化学 .....	11
2.2.6 冰冻切片的制备 .....	12
2.2.7 免疫荧光组织化学染色法（免疫荧光） .....	12
2.2.8 细胞的传代 .....	13
2.2.9 细胞的冻存和复苏 .....	13
2.2.10 MTT 法测定细胞生长情况 .....	14
2.2.11 Western blot 检测蛋白表达 .....	14
2.2.11.1 蛋白样品制备 .....	14
2.2.11.2 免疫印迹实验 (Western blot) .....	15
2.2.12 统计学分析 .....	15
第三章 实验结果 .....	17
3.1 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤抗新生血管的作用 .....	17
3.2 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤抗炎症的作用 .....	18
3.3 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤上皮的修复作用 .....	19
3.4 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤中抗新生血管和抗炎机制 .....	20
3.5 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤中上皮修复的机制 .....	23
第四章 讨论 .....	25
第五章 结论 .....	29
参考文献 .....	30

## 目录

第二部分 SERPINA4 对糖尿病视网膜新生血管及炎症的治疗及机制 .....	37
第一章 前言 .....	37
第二章 实验材料与方法 .....	42
2.1 实验材料 .....	42
2.1.1 细胞株、实验动物 .....	42
2.1.2 主要化学试剂和耗材 .....	42
2.1.3 抗体 .....	43
2.1.4 哺乳动物细胞培养试剂.....	43
2.1.5 主要仪器 .....	43
2.1.6 主要溶液的配制 .....	45
2.1.6.1 组织、细胞染色相关溶液.....	45
2.1.6.2 细胞培养相关溶液.....	45
2.1.6.3 蛋白质抽提及电泳相关溶液.....	46
2.1.6.4 其他溶液.....	46
2.2 实验方法 .....	47
2.2.1 SERPINA4 转基因的质粒构建 .....	47
2.2.2 视网膜新生血管模型 (OIR) .....	47
2.2.3 糖尿病小鼠模型 .....	48
2.2.4 链脲霉素(STZ)诱导糖尿病模型 .....	49
2.2.5 H&E 染色和免疫组织化学 .....	49
2.2.6 冰冻切片的制备 .....	50
2.2.7 免疫荧光组织化学染色法 (免疫荧光) .....	51
2.2.8 细胞的传代 .....	51
2.2.9 细胞的冻存和复苏 .....	52
2.2.10 细胞的转染 .....	52
2.2.11 细胞溶液的收集.....	52
2.2.12 TOPFLASH 活性检测 .....	52
2.2.13 Western blot 检测蛋白表达.....	53
2.2.13.1 蛋白样品制备.....	53
2.2.13.2 免疫印迹实验 (Western blot) .....	54
2.2.14 酶联免疫吸附实验 (ELISA) .....	55
2.2.15 免疫共沉淀(Co-IP).....	55
2.2.16 统计学分析 .....	56
第三章 实验结果 .....	57
3.1 SERPINA4 对 OIR 诱导的视网膜新生血管、炎症的抑制作用.....	57
3.2 SERPINA4 对小鼠糖尿病视网膜炎症及血管渗漏的抑制作用 .....	59
3.3 SERPINA4 在 OIR 和糖尿病小鼠模型中抑制 Wnt 信号通路 .....	61
3.4 SERPINA4 抑制 Wnt3a 和 LRP6 诱导的 Wnt 信号通路的 $\beta$ -catenin 转运 .....	63
3.5 SERPINA4 阻断由高糖或者 Wnt3a 诱导的 Wnt 信号通路激活.....	65
3.6 SERPINA4 与 LRP6 的高度特定结合 .....	67
第四章 讨论 .....	70
第五章 结论 .....	73
参考文献 .....	74
附录一 英文缩略词索引 .....	82

## 目录

附录二 在学期间发表论文 .....	84
附录三 会议摘要 .....	85
附录四 综述 .....	85
致谢 .....	97

厦门大学博硕士论文摘要库

# CATALOGUE

## CATALOGUE

<b>Abstract in Chinese .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>III</b>
<b>Catalogue in Chinese.....</b>	<b>VII</b>
<b>Catalogue.....</b>	<b>X</b>
<b>Part 1 Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of SERPINA3K.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter I Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapter II Materials and Methods .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Materials.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Cell line and animals .....	5
2.1.2 Major chemical reagents .....	5
2.1.3 Antibodies.....	5
2.1.4 Reagents for mammal cell culture.....	6
2.1.5 Major equipments .....	6
2.1.6 Major buffer.....	7
2.1.6.1 Cell and tissue staining buffers .....	7
2.1.6.2 Cell culture buffers.....	8
2.1.6.3 Protein extract and electrophoresis buffers.....	8
2.1.6.4 Other buffers.....	9
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Protein purification.....	9
2.2.2 Corneal alkali burn model.....	9
2.2.3 Neovascularization and inflammation evaluation .....	10
2.2.4 Corneal epithelium injury evaluation .....	10
2.2.5 H&E staining and Immunohistochemistry.....	11
2.2.6 Frozen slides preparation.....	12
2.2.7 Immunofluorescence.....	12
2.2.8 Cell propagation.....	13
2.2.9 Cell frozen storage and resuscitation .....	13
2.2.10 MTT assay .....	14
2.2.11 Western blot assay.....	14
2.2.11.1 Protein samples preparation .....	14
2.2.11.2 Western blot .....	15
2.2.12 Statistic analysis.....	15
<b>Chapter III Results.....</b>	<b>17</b>
3.1 SERPINA3K anti-neovascularization in alkali burn rat cornea .....	17
3.2 SERPINA3K anti-inflammation in alkali burn rat cornea .....	18
3.3 SERPINA3K improves epithelial healing in alkali burn rat cornea .....	19
3.4 Mechanisms of SERPINA3K anti-NV and anti-inflammation .....	20
3.5 Mechanisms of SERPINA3K enhance epithelial corneal healing .....	23
<b>Chapter IV Discussion.....</b>	<b>25</b>
<b>Chapter V Conclusion.....</b>	<b>29</b>
<b>References .....</b>	<b>30</b>

# CATALOGUE

<b>Part 2 Effects of SERPINA4 on diabetic retinopathy and its mechanisms.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapter I Introduction.....</b>	<b>37</b>
<b>Chapter II Materials and Methods .....</b>	<b>42</b>
<b>2.1 Materials.....</b>	<b>42</b>
2.1.1 Cell line and animals .....	42
2.1.2 Major chemical reagents .....	42
2.1.3 Antibodies .....	43
2.1.4 Reagents for mammal cell culture.....	43
2.1.5 Major equipment .....	43
2.1.6 Major buffer.....	45
2.1.6.1 Cell and tissue staining buffers .....	45
2.1.6.2 Cell culture buffers.....	45
2.1.6.3 Protein extract and electrophoresis buffers.....	46
2.1.6.4 Other buffers.....	46
<b>2.2 Methods .....</b>	<b>47</b>
2.2.1 SERPINA4 plasmid construction .....	47
2.2.2 Oxygen-induced retinopathy models(OIR) .....	47
2.2.3 Diabetic animal model.....	48
2.2.4 STZ induced diabetic animal model .....	49
2.2.5 H&E staining and Immunohistochemistry.....	49
2.2.6 Frozen slides preparation.....	50
2.2.7 Immunofluorescence.....	51
2.2.8 Cell propagation.....	51
2.2.9 Cell frozen storage and resuscitation .....	52
2.2.10 Cell transfection .....	52
2.2.11 Condition media collection .....	52
2.2.12 TOPFLASH activity assay.....	52
2.2.13 Western blot assay.....	53
2.2.13.1 Protein samples preparation .....	53
2.2.13.2 Western blot .....	54
2.2.14 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) .....	55
2.2.15 Co-Immunoprecipitation assay .....	55
2.2.16 Statistic analysis .....	56
<b>Chapter III Results.....</b>	<b>57</b>
3.1 SERPINA4 anti-NV and anti-inflammation in OIR.....	57
3.2 SERPINA4 anti-inflammation and vascular leakage in DR.....	59
3.3 SERPINA4 inhibits Wnt induced by OIR and diabetes.....	61
3.4 SERPINA4 $\beta$ -catenin transcription in Wnt.....	63
3.5 SERPINA4 blocks Wnt induced by high glucose and Wnt3a.....	65
3.6 SERPINA4 highly specific binding to LRP6.....	67
<b>Chapter IV Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>Chapter V Conclusion .....</b>	<b>73</b>
<b>References .....</b>	<b>74</b>
<b>Appendix I The Index of English abbreviations.....</b>	<b>82</b>

## CATALOGUE

---

<b>Appendix II</b>	<b>Publications .....</b>	<b>84</b>
<b>Appendix III</b>	<b>Meeting Abstract.....</b>	<b>85</b>
<b>Appendix IV</b>	<b>Review .....</b>	<b>85</b>
<b>Acknowledgement.....</b>		<b>97</b>

厦门大学博硕士论文摘要库

# 第一部分 SERPINA3K 对大鼠角膜碱烧伤的抗新生血管和抗炎作用

## 第一章 前言

眼部新生血管性疾病是损害人类视力的主要疾病，包括角膜新生血管形成、虹膜睫状体新生血管形成、视网膜脉络膜新生血管形成，以及黄斑新生血管形成等<sup>[1, 2]</sup>。近年来，虽然激光、手术及放射疗法已能在一定程度上缓解或阻止眼部新生血管的发生发展，但均有不可避免地损伤健康组织的潜在危险，且不同程度地存在疗效欠佳、代价昂贵及复发等弊病。因此，寻求特异及有效的药物治疗眼部新生血管一直是眼科领域的研究热点。

角膜作为眼屈光介质的的重要组成部分，其主要特征是透明和无血管。病理状态下，角膜的血管化造成了角膜不透明，严重影响视力并改变角膜相对免疫赦免状态，增加了角膜移植术后的排斥率<sup>[3]</sup>。如何有效防治角膜新生血管是眼科临床工作中的难题。以往的研究中，新生血管相关的许多促抗因子相继发现，但产生新生血管形成的详细机制及各因子之间关系纷繁复杂，至今仍未完全明确。

目前新生血管学说认为，调节新生血管形成是促新生血管因子和抑制新生血管因子动态平衡的过程，例如 VEGF 和 PEDF 的动态平衡<sup>[4-7]</sup>。当此平衡被破坏，如 VEGF 水平过高，或 PEDF 水平过低，有可能导致新生血管的形成。研究发现人和动物体内存在内源性新生血管抑制剂。最近的研究还发现自然界的几个主要的内源性新生血管抑制剂包括 PEDF，SERPINE1，AAT 等均出自丝氨酸蛋白酶抑制剂超级家族 (SERPINs)<sup>[8-12]</sup>。

本文重点研究 SERPIN 家族成员对眼部新生血管以及炎症的作用和机制。丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serine proteinase inhibitor, SERPIN) 超家族是一类具有共同来源、结构序列高度同源的蛋白酶抑制剂家族。SERPIN 超家族的主要功能是中和过度表达的丝氨酸蛋白酶活性，从而参与血凝、纤维蛋白溶解、补体激活、炎症反应、组织重建等功能，维持机体内环境的稳定。本论文中我们主要选用 SERPIN 家族中 2 个成员 SERPINA3K 和 SERPINA4 进行研究。（有关 SERPINA4 的介绍请详见本论文的第二部分）。

最早的 SERPIN 由 Fermi 于 1894 年在人血浆中发现，1955 年 Schultze 分离纯化得到，后被命名  $\alpha 1$  蛋白酶抑制 ( $\alpha 1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha 1$ -PI)，又称  $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶 ( $\alpha 1$ -proteinase inhibitor,  $\alpha 1$ -AT)。现已发现这个家族至少有 40 多种成员，广泛的分布



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库